

# eCG を併用した FSH 皮下 1 回投与による過剰排卵処理の検討

## 第 2 報 eCG 投与時期の検討

研究開発第二課 倉田佳洋 松田浩典 西野治\* 朝倉康夫\*\*

※現 奈良県家畜保健衛生所 ※※現 奈良県食肉公社

### 要 約

黒毛和種への卵胞刺激ホルモン（以下 FSH とする）皮下 1 回投与による過剰排卵成績の向上のために、妊馬血清性腺刺激ホルモン（以下 eCG とする）を併用する際の投与時期の検討を目的として、FSH 頸部皮下 1 回投与の 2 日後の午前に eCG 400 IU を投与したものを試験 1 区、午後に eCG 400 IU を投与したものを試験 2 区、eCG 400 IU 未投与を試験 3 区とし、採胚成績および過剰排卵処理（以下 SOV とする）開始から採胚時までの卵巣所見を各区で比較した。

採胚成績では試験 1 区が採胚総数 25 個、正常胚数 16.3 個、正常胚率 78%で試験 2 区（採胚総数 8.5 個、正常胚数 5.5 個、正常胚率 75%）及び対照区（採胚総数 9 個、正常胚数 3.3 個、正常胚率 62.5%）より多い結果となった。卵質成績においても A+A'ランクの受精胚が試験 1 区で 12.6 個となり、試験 2 区の 5 個及び対照区の 3.3 個よりも A+A'の個数と正常胚中の割合において多い結果となった。卵胞発育では各区とも同様の推移を示したが、AI 直前における 5mm 以上の卵胞数が試験 1 区で 33 個となり試験 2 区の 23.5 個や対照区の 22 個よりも多くなった。

これらの結果から FSH 皮下 1 回投与による黒毛和種の過剰排卵処理における eCG の投与時期は PRID 抜去の半日前である PRID 挿入後 6 日目（FSH 皮下 1 回投与の 2 日後）の午前中が適期と考えられた。

### 緒 言

ウシの体内胚生産において FSH の漸減投与方法による SOV は注射回数が多く牛へはストレスとなり人へは作業負担がかかり、これらの軽減が長年の課題になっていた。

近年、当県が参加する共同研究グループは生理食塩水を溶媒とした FSH 皮下 1 回投与方法が漸減投与方法と同等の採卵成績を得られることを報告した<sup>1)2)3)4)</sup>。また、シンディ種において、eCG を併用して漸減投与の SOV を行うと排卵数及び胚の品質が向上するとの報告があった<sup>5)</sup>。

そこで FSH 皮下 1 回投与に eCG を併用しても採胚成績が向上するか検討した。前報では eCG の投与回数について検討を行ったが、投与回数が 1 回および 2 回でも採胚成績等に大きな差が見られなかったことから、今報では eCG の投与回数を 1 回に設定し、eCG の LH 様作用による卵胞成熟のための感作時間の違いが採胚成績に及ぼす影響を考えるため eCG の投与時期の検討を行った。

なお、本試験は 11 府県との共同研究として行っており、今報告は当県のデータのみでの報告である。

## 材料及び方法

### 1. 方法

発情および発情直後を避けて、プロジェステロンとエストロゲン徐放剤（PRID TEIZO：あすか製薬株式会社）を挿入した（0日目とする）。4日目に生理食塩水（大塚生食注：大塚製薬株式会社）50mlを溶媒としたFSH（アントリンR10：共立製薬株式会社）20AUを皮下1回投与し、プロスタグランジンF2 $\alpha$ 製剤を同時投与した。6日目にeCG（動物用セロトロピン：あすか製薬株式会社）400IUを午前に投与したものを試験1区、午後PRID抜去と同時に投与したものを試験2区、無投与を対照区とした。7日目午後GnRH（動物用イトレリン注射液：あすか製薬株式会社）を筋注し、8日目午後定時AIを行い、15日目午前に採卵した（図1）。

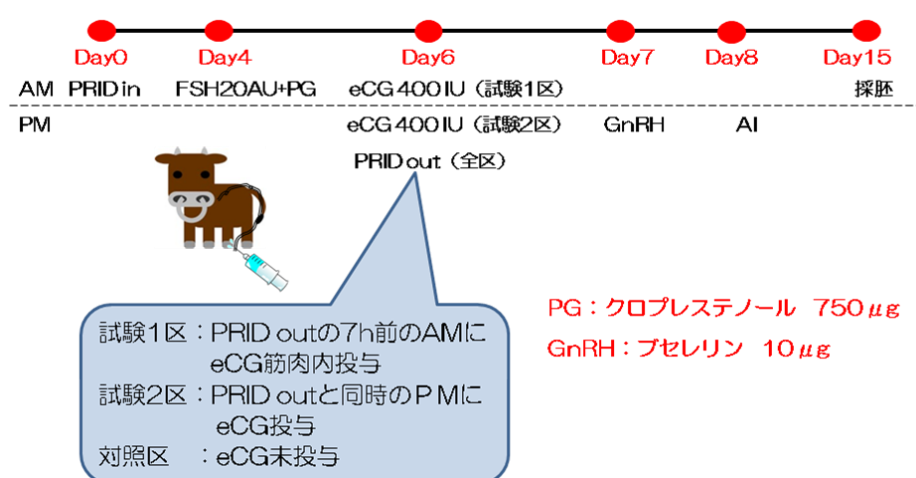


図1 採卵プログラム

### 2. 供試牛

当センターで繋養している黒毛和種経産牛3頭を各3回供試し、試験区を各区反転させるラテン方格法により配置し計9回採卵を行い、それぞれの採卵間隔は63日以上とした（表1）。

表1 供試牛

牛番号	B158	B169	B175
生年月日	H18.7.19	H19.5.12	H20.4.15
産歴	3	2	2
最終分娩日	H23.11.2	H23.11.17	H23.12.2
過去の平均正常胚数	13.8	16.8	2.4
試験1回目	試験1区	試験2区	対照区
試験2回目	試験2区	対照区	試験1区
試験3回目	対照区	試験1区	試験2区

### 3. 調査項目

採卵成績においては採卵時に採卵総数、正常胚数、変性卵数、未受精卵数、採卵時黄体数、遺残卵胞数を記録し、実体顕微鏡による形態学的な卵質調査を行った。正常卵の品質および変性胚、未受精卵の判定は「胚の衛生的取扱いマニュアル」の「胚の品質コード」に準じて行った<sup>9)</sup>。

また卵巣所見においては、PRID 挿入後 4 日目の SOV 開始から 15 日目の採卵日まで 24 時間毎に超音波画像診断装置（日立メディコ 本体；ECHOPAL II、プローブ；EUP-033(7.5MH)）により黄体数及び卵胞発育調査を行った。卵胞は直径により 5mm 以上と 5mm 未満と区分して記録した。なお、供試数が少ないため統計処理については行わなかった。

### 結 果

採卵成績においては黄体数では各試験区で大きな差は見られなかったが、試験 1 区が採卵総数 25 個、正常胚数 16.3 個、正常胚率 78% で試験 2 区（採卵総数 8.5 個、正常胚数 5.5 個、正常胚率 75%）及び対照区（採卵総数 9 個、正常胚数 3.3 個、正常胚率 62.5%）より多かった（表 2）。変性胚数は試験 1 区で 6.7 個と試験 2 区の 2 個及び対照区の 0.3 個より多くなったが、未受精卵数では試験 1 区の 2 個及び試験 2 区の 1 個と、対照区の 5.3 個より少ない結果となった。

卵質成績においても A+A' ランクの受精胚が試験 1 区で 12.6 個となり、試験 2 区の 5 個及び対照区の 3.3 個よりも多かった（表 3）。

卵胞発育では各区とも同様の推移を示したが、AI 直前における 5mm 以上の卵胞数が試験 1 区で 33 個となり試験 2 区の 23.5 個や対照区の 22 個よりも多い傾向となった（図 2）。また各区とも AI 日を過ぎると 5mm 以上の卵胞が減少していたが、AI 翌日において試験 1 区が試験 2 区よりも 5mm 以上の卵胞の数が少ない結果となった。

表 2 試験区別採卵成績（平均 n=3）

試験区	eCG 投与時期	黄体数	遺残卵胞数	採卵総数	正常胚数	変性胚数	未受精卵数	正常胚率
試験 1 区	eCG AM 投与	21.7	8	25	16.3	6.7	2	78%
試験 2 区	eCG PM 投与	23.5	4	8.5	5.5	2	1	75%
対照区	eCG 未投与	19.7	4.7	9	3.3	0.3	5.3	62.5%

※正常胚率は各試験区の採卵毎の正常胚率の平均とする

表 3 試験区別卵質成績（平均 n=3）

試験区	A	A'	A+A'	B	C
試験 1 区	4.3	8.3	12.6	1.7	2
試験 2 区	0.5	4.5	5	0.5	0
対照区	0.7	1.3	2	0.7	0.7

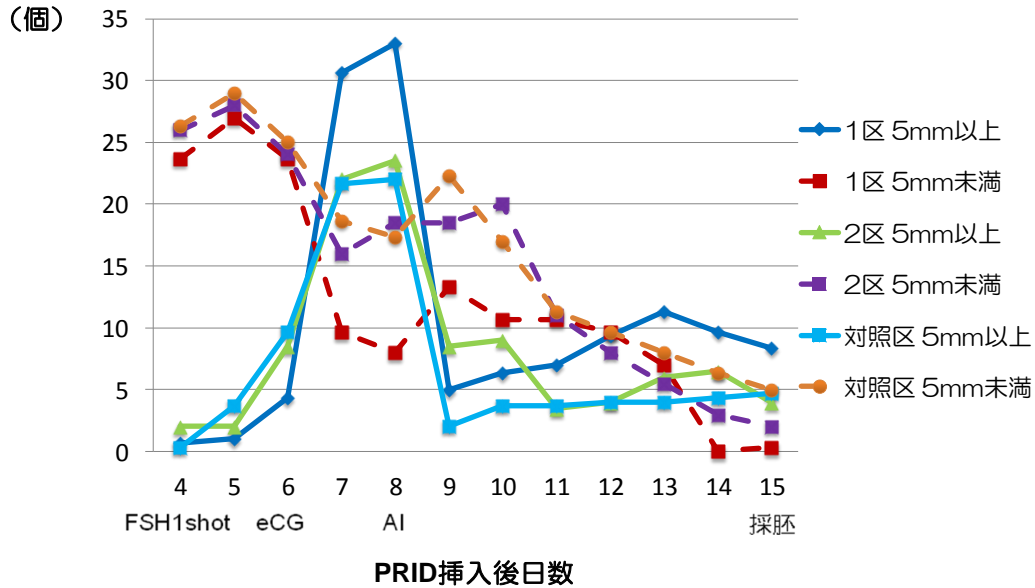


図2 卵胞発育の推移

## 考 察

本試験は、第1報で行ってきたeCGを併用したFSH皮下1回投与による過剰排卵処理試験の継続で、前報までの試験によりeCGをPRID挿入後6日目(FSH皮下1回投与の2日後)に1回投与と設定し、本試験でeCGの投与時期を検討した。Mattosらによる報告<sup>5)</sup>と第1報で行ったeCG投与から黄体ホルモン製剤除去までの時間が異なることから、PRID除去までのeCGのLH様作用による卵胞成熟のための感作時間による採胚成績への影響の検討となる。

採胚成績より採胚時の黄体数では各区とも大きな差は見られなかったが、試験1区で採胚総数、正常胚数が、試験2区と対照区よりも高い結果となった。また卵胞発育の推移では試験1区がAI直前において5mm以上の卵胞数が最も多く、試験2区と対照区は同程度の数となっていた。供試頭数が少ないため個体差による影響も考慮されるが、eCGの感作時間をPRID抜去の前に設定したことによる黄体ホルモンレベルが低下するまでの間の時間を確保することによって、Mattosらによる報告<sup>4)</sup>のとおりeCGのLH様作用がAI直前までの卵胞及び卵子の成熟を促進したことが、卵胞数の増加とその後の胚の品質向上につながったと考えられた。またいずれの試験区でも5mm以上の卵胞数がAI後に低下していることから排卵が起こったと考えられるが、AI翌日における5mm以上の卵胞の数において試験1区が試験2区よりも少なくなったことから、eCGの感作時間を長くしたことが卵胞と卵子の成熟につながり排卵時期を更に集中させたと考えられた。

これらの結果から、FSH皮下1回投与による黒毛和種の過剰排卵処理におけるeCGの投与時期はPRID抜去の半日前であるPRID挿入後6日目(FSH皮下1回投与の2日後)の午前中が適期と考えられる。

第1報と今回の結果よりFSH皮下1回投与による過剰排卵処理におけるeCGの併用は、PRID抜去の半日前に1回投与することで胚の品質を向上させることが示唆された。

## 参考文献

- 1) 西野 治ら：卵胞刺激ホルモン製剤1回投与による黒毛和種の過剰排卵処理の簡易化の検討 奈良県畜産技術センター研究報告 第40号 xx-xx (2015)
- 2) 平泉真吾ら：生理食塩水を溶媒とした卵胞刺激ホルモン (FSH) 皮下1回投与法により牛の過剰排卵処理が可能である 第24回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 52-53
- 3) 平泉真吾ら：Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine FSH treatment or six intramuscular treatments over three days Theriogenology Vol.83 No.4 466-473(2015)
- 4) 及川俊徳ら：黒毛和種過剰排卵処理の簡易化に向けた共同試験の取り組み 日本胚移植学会雑誌 Vol.35 No.2 55-59(2013)
- 5) Mattos ら：Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors Animal reproduction science Vol.125 No.1 119-123(2011)
- 6) 社団法人畜産技術協会：胚の衛生的取り扱いマニュアル第3版(2001)